植 物 分 类 与 资 源 学 报 2011, **33** (3): 311~329
Plant Diversity and Resources DOI: 10.3724/SP.J.1143.2011.10191

植物种质资源超低温保存概述*

文 彬
(中国科学院西双版纳热带植物园, 云南 勐腊 666303)

摘要: 简要回顾了植物种质资源超低温保存的历史, 说明了超低温保存植物材料的多样性, 阐述了超低温耐性的生物学基础及超低温伤害产生的原因和类型, 介绍了各种常用超低温保存方法的技术要点, 并对生产顽拗性种子的植物种质资源的超低温保存作了专门的论述, 分析了生产顽拗性种子的植物种质资源超低温保存的潜力、现状和困难, 指出顽拗性种子的超低温保存是植物种质资源超低温保存的重点和难点, 而真正实现用超低温保存技术贮藏顽拗性植物种质资源还有很长的路要走。

关键词: 种质资源; 超低温保存; 超低温耐性; 超低温伤害; 顽拗性种子
中图分类号: Q 945.79 **文献标识码**: A **文章编号**: 2095-0845(2011)03-311-19

An Introduction to Cryopreservation of Plant Germplasm

WEN Bin
(*Xishuangbanna Tropical Botanical Garden*, *Chinese Academy of Sciences*, Mengla 666303, China)

Abstract: This paper recited the history of plant germplasm cryopreservation, exhibited the diversity of cryopreservated plant materials, analysed biological foundation of plant cryotolerance, causes and types of cryo-injury, described the key techniques of frequently-used cryopreservation methods, and paid special attention to cryopreservation of plant germplasm of species producing recalcitrant seeds. Based on analysis of potential, status and difficulties, the author thought that regard to cryopreservation of plant germplasm of recalcitrant-seeded species there are much to do, for it was the keystone and difficult part of plant germplasm cryopreservation.

Key words: Germplasm; Cryopreservation; Cryotolerance; Cryo-injury; Recalcitrant seeds

1 植物种质资源超低温保存概况

超低温保存 (cryopreservation) 是指在-100℃及更低温度下保存生物材料, 也有些研究者把超低温的温度限定在-130℃及以下 (Withers, 1986; Fuller, 2004), 但无论如何, 在-80℃以上保存的材料是不稳定的。虽然-80℃保存能够保持材料的冻结状态, 短期内对细胞的活力没有太大的影响, 但细胞内会发生水分转移和重结晶现象, 最终导致细胞结构的破坏和死亡。因为液态氮化学性质稳定而价格又比较便宜, 使得液态氮成为超低温保存中最常用的冷冻介质。当材料悬挂在液氮上方气相介质中时温度约为-130℃, 而当材料浸没在液氮中时温度为-196℃。因为在超低温下, 活细胞内的物质代谢和生命活动几乎完全停止, 生命物质处于非常稳定的生物学状态, 故贮藏期间不可能发生遗传状态的改变或形态潜能的丧失, 因此超低温保存被认为是"永久"保存生物样品的理想方法。由于在生物圈内找不到自然的超低温条件, 可以想见, 超低温保存是随着制冷技术的进步出现的新鲜事物。

人类在 1877、1898 和 1908 年实现了空气、氢气和氦气第一次液化, 并相应的获得了-192℃、

* 基金项目: 国家自然科学基金 (30571526) 和中国科学院院长基金。本文系作者博士论文的一部分
收稿日期: 2010-11-02, 2011-02-10 接受发表
作者简介: 文彬 (1967-) 男, 博士, 副研究员, 主要从事种子生物学、低温生物学和保护生物学的研究。E-mail: wenb@xtbg.org.cn

-253℃和-269℃的超低温，而在1897年、1899年和1925年分别有了用液态空气、液态氢、液态氦处理植物种子的尝试（转引自Lockett和Luyet，1951）。这样的尝试一直延续了几十年，如Selby（1901），Lipman和Lewis（1934），Lipman（1936）。这些实验很大程度上是为了满足人类的好奇心，并不是为了利用超低温来实现植物种质资源的长期贮藏，还不能算是真正意义上的超低温保存。

由于最初用超低温处理种子的实验大都比较容易地取得了成功，植物种子经超低温处理后发芽率没有发生明显的改变，也由于当时还缺乏对顽拗性种子的认识，致使人们误以为所有植物种子理所当然的都能够经受超低温处理，导致植物种质资源超低温保存方面的研究长期裹足不前。虽然很早Becquerel（1905）和Adams（1905）就分别报道了用液态空气处理高含水量种子是致命的，但直到近半个世纪后才有人研究种子含水量与超低温处理后种子存活的关系（Lockett和Luyet，1951）。

现代意义上的植物种质资源超低温保存研究得益于低温生物学在动物学和医学方面的发展，同时植物低温驯化和冻害研究方面的工作也功不可没。Polge等（1949）采用添加防冻保护剂，慢速降温，然后转移到液态氮中的方法，实现了人和多种动物精子的超低温保存。这一技术逐步发展和完善，成为超低温保存的传统方法，也称作二步法，这也是植物材料超低温保存最早使用的方法。根据材料的特点和研究的目的，目前植物超低温保存有如下几个主要方面的研究和应用：（1）重要实验用细胞株系的保存，如放线菌（廖爱芳和林永珠，1999）、短杆菌（方呈祥等，1996）、花叶病毒（宋淑云等，2005）等；（2）优良农作物品系的保存，如柿品种“禅寺丸”（艾鹏飞和罗正荣，2004）、“品丽珠”葡萄（赵艳华和吴永杰，2001）、马哈利樱桃（赵艳华等，1999）等；（3）遗传育种材料的保存，如水稻胚性悬浮细胞（王君晖等，1996a；Wang等，1998）、野生稻愈伤组织（殷晓辉等，1996）、杂交水稻恢复系花粉（胡晋和郭长根，1996）、水稻单倍体不定芽（章志宏和胡中立，2000）、烟草悬浮细胞（Kobayashi，2005）等；（4）保护生物学方面植物多样性种质资源的保存，如杜仲和秤锤树的花粉（陈品良等，1990）、银杏的胚和花粉（徐刚标等，2000a，b）等。

2 植物种质资源超低温保存的材料类型

经过几十年的探索和发展，超低温保存已经被尝试用于几乎所有类型的植物材料并取得了不同程度的成功，积累了非常丰富的资料。这里，笔者根据植物材料的来源与超低温保存的难度，划分为4个类型并分别说明。

2.1 繁殖器官

正常性种子因为在种子发育后期存在成熟脱水过程，种子脱落后还可以进一步脱水，不含或只含有很少的可冻结水，是最早也是最容易成功实现超低温保存的生物材料（Selby，1901；Lipman和Lewis，1934；Lipman，1936）。关于正常性种子超低温保存的研究很多，直到上世纪90年代还一直有这方面的报道。Sakai和Noshiro（1975）报道了5种农作物种子超低温保存的研究；Stanwood和Roos（1979）报道了14种蔬菜和花卉种子超低温保存的研究；Stanwood和Bass（1981）做了120种农作物、蔬菜、花卉和林木种子的超低温保存研究，除亚麻（*Linum usitatissimum*）和胡麻（*Sesamum indicium*）外都取得了成功；Styles等（1982）报道了24种植物种子保存600天的超低温保存的研究；Stanwood（1985）报道了155个种455个批次的种子成功超低温保存的实验；Pence（1991b）报道了用液氮保存俄亥俄州237种乡土植物527个批次种子的研究，约80%的种类不受液氮处理的影响；Iriondo等（1992）报道了14种农作物和野生植物种子超低温保存的研究；Touchell（1993），Touchell和Dixon（1994）做了90种澳大利亚本土植物种子的超低温保存研究，2/3以上的物种超低温处理后有存活的种子，并且认为40%以上的澳大利亚稀有濒危植物可以用超低温的方法长期保存；张北壮等（1990）报道了25种农作物及蔬菜种子的超低温贮存研究，除苦瓜外，其余种子的发芽率和活力与未用液氮处理的对照没有明显的不同；刘燕等（2001）报道了47种园林花卉植物种子超低温保存研究等。耐脱水的细菌和各个门类植物的孢子也是比较容易被超低温保存的材料，解冻后可以通过萌发、生长，建

成新的植株体，如放线菌（廖爱芳和林永珠，1999）、短杆菌（方呈祥等，1996）、牟氏角刺藻和新月菱形藻（王起华等，1999）、盐生杜氏藻和青岛大扁藻（王起华等，2000a）、小球藻（蔡小宁等，2004）、大叶黑桫椤孢子（徐艳等，2006）等。被子植物的花粉大都是比较耐脱水的，经适度的人工干燥后可以成功超低温保存，待需要时解冻用于人工授粉或组织培养，如杜仲和秤锤树（陈品良等，1990）、紫苔菜（梁立等，1993）、油菜（Xu 等，1997）、柿（艾鹏飞和罗正荣，2004）和梅花（刘燕和张亚利，2004）。也有超低温保存不成熟的繁殖器官，解冻后通过组织培养方法培养成苗，如大麦幼穗（王君晖等，1996b）。

2.2　营养器官

植物的一些幼嫩组织，如分生组织、茎尖、根尖、节间等，主要由分化程度低、分裂能力强的分生细胞组成，这些细胞具有体积小、形状规则、细胞质浓、液泡少等特点，因而具有比较高的超低温耐性，常常用作超低温保存的材料，解冻后可以作为外植体，通过组织培养恢复成植株。生产上，有性繁殖常常导致果树的品质退化，因此优良的果树品种都需要以营养体进行无性繁殖以保持果树的品质，超低温保存就可以用来保存这些植株的营养繁殖体，如甘蔗的茎尖（Gonzalez-Arnao 等，1993；Paulet 等，1993）、苹果离体茎尖（赵艳华等，1998；吴永杰等，1999）、柿休眠芽茎尖（艾鹏飞和罗正荣，2003）、柑橘茎尖（王子成和邓新秀，2001）、猕猴桃的茎段（简令成和孙龙华，1989）等。低等植物如坛紫菜的自由丝状体（王起华等，2000b）。

另外，一些温带植物的小枝，在完成低温驯化后可以被成功的超低温保存，解冻后可以通过扦插或嫁接恢复成苗，如杨（*Populus maximowichi*，*P. simonii*，*P. nigra*，*P. glaubka*）、柳（*Salix sachalinensis*，*S. yezoensis*，*S. koriyanagi*，*S. sieboldiana*）、桦（*Betula taushii*，*B. eymani*）、松（*Pinus pumira*）（Sakai，1966）。另据报道，豌豆（Sun，1958）和拟南芥（Liu 等，1999）的幼苗被成功的超低温保存并在解冻后恢复生长。

2.3　组织培养物

植物外植体，无论来自营养器官还是繁殖器官，经过一定的组织培养后，脱分化为各种超低温耐性较高的组织，再用于超低温保存将有更高的成功机会，解冻后可以继续进行组织培养恢复成完整的植株。可用于组织培养的外植体是具有较高脱分化能力的植物组织和器官，如分生组织、茎尖、根尖、节间，子房、胚珠、花药等。用于超低温保存的组织培养物有悬浮培养细胞、原生质体、胚性愈伤组织、体细胞胚、小孢子胚等。如：毛地黄悬浮细胞系（Diettrich 等，1982）、大白菜悬浮细胞系（罗美中等，1990）、海带雌性配子体克隆细胞（刘涛等，2006），新疆紫草的愈伤组织（李国风等，1992）、猕猴桃愈伤组织（李嘉瑞等，1996）、凹叶厚朴愈伤组织（刘贤旺和杜勤，1996）、糜子的愈伤组织（孙德兰等，1988）、玉米的愈伤组织（孙龙华等，1989）、杏的愈伤组织和原生质体（马锋旺和李嘉瑞，1998，1999）、柑橘的原生质体（王子成和邓新秀，2002）、水稻原生质体细胞团（唐定台等，1988）、铁皮石斛的原球茎和类原球茎体（王君晖等，1999）、油菜（*Brassica napus*）的小孢子胚（Brown 等，1993）、油棕的体细胞胚（Dumet 等，1993）、咖啡的体细胞胚（Senaratna 等，1991；Hatanaka 等，1994）等。

保存组织培养物是植物种质资源超低温保存早期工作的主要内容，最早是由 Quatrano 在 1968 年首次报道。现在，一些重要的细胞学实验材料仍需要用这种方式保存原生质体、悬浮细胞或者愈伤组织。一些顽拗性种子超低温保存胚或胚轴很难成功，转而保存组织培养物常常可以获得比较好的结果，如芒果（Wu 等，2003）、龙眼和荔枝（郭玉琼，2007）。但必须指出的是，一粒种子（或者胚/胚轴）包含的遗传资源跟一棵参天大树等同，一批种子就是一片沉睡的森林，而组织培养物的遗传多样性是很贫乏单一的。因此，以生物多样性保护为目的的超低温保存，应该尽可能保存完整的种子或离体胚/胚轴。

2.4　顽拗性/中间型种子

这里，笔者将顽拗性/中间型种子从前文的繁殖器官中分离出来单独作为一类，是因为顽拗性/中间型种子的超低温保存所要求的技术难度大，成功的机会小，是低温生物学需要研究的重点和难点。顽拗性种子对低温和脱水都敏感，而

且在种子的发育和萌发之间没有明显的静止期，被认为是萌发中的“正常性种子”。部分吸涨的正常性种子被用来模拟顽拗性种子对超低温处理的反应，如土豆（Grout，1979）、莴苣（Kaurin 和 Stushnoff，1985）、玉米（Boucaud 和 Cambecedes，1988）。顽拗性种子的超低温保存一般都是以离体胚或胚轴为材料，成功保存完整的顽拗性种子的报道很少见到。中间型种子既有保存完整种子的，也有保存离体胚或胚轴的，依种而论。如番木瓜（Becwar 等，1983；Chin 和 Krishnapillay，1989）、柑橘类（Hor 等，2005）的种子可以完整保存，咖啡（Abdelnour-Esquivel 等，1992；Vasquez 等，2005）和油棕（Engelmann 等，1995）既可以保存离体胚也可以保存完整的种子，但离体胚超低温处理后的存活率远高于整粒种子。Grout 等（1983）发现油棕的离体胚比完整的种仁具有高得多的脱水耐性，并首先成功的实现了油棕胚的超低温保存，其后，南洋杉（Pritchard 和 Prendergast，1986）、橡胶（Normah 等，1986）、可可（Pence，1991a）、椰子（Assy-Bah 和 Engelmann，1992a，b）、菠萝蜜（Thammasiri，1999；Krishnapillay，2000）、咖啡（Abdelnour-Esquivel 等，1992）、茶（Chandel 等，1995）、野生稻（*Zizania palustris*）（Touchell 和 Walters，2000）、银杏（徐刚标等，2000a）及若干温带顽拗性植物（Pence，1990，1992；郑郁善等，2002）的胚/胚轴被成功的超低温保存。

3 植物的低温耐性

在长期的进化过程中，植物形成了许多适应低温环境的习性，如冬季落叶、休眠、降低含水量、积累糖份和胁迫相关蛋白以及抗冻蛋白。如前所述，很早就有人注意到高含水量是导致超低温保存过程中种子死亡的重要原因（Becquerel，1905；Adams，1905；Lockett 和 Luyet，1951），水分含量及水的相变关系到植物能否经受低温的考验，冷冻前降低材料的含水量具有重要意义。温带植物在冬季来临前都会出现含水量降低、胞质浓度升高的现象，这可能是细胞脱水和积累保护性物质两个过程的共同结果。正常性种子在发育过程的末期也都有一个主动脱水的过程（成熟脱水）。自然界的水在零度附近结冰，但为什么温带植物能够经受冬天零下几十度的低温却并没有被冻死呢？这是因为许多情况下水分在植物细胞中并没有结冰，而是处于过冷却状态。自然界的水因为含有丰富的结晶核，因此在降温过程中水分子首先在结晶核周围结成冰晶，然后逐渐向外围扩展，最后整个水体结冰。这一过程称为异核结冰。植物细胞内因为缺少这样的结晶核，因此胞内水分并不会在零度附近结冰，但当温度降低至-30℃附近时，水分子可以以自身为结晶核结成冰晶。这一过程称为同核结冰。植物细胞同核结冰的温度因细胞胞质的浓度而异，胞质浓稠的细胞，过冷却的温度会低一些，添加低温保护剂会使得过冷却温度降得更低。同时，植物器官的一些特殊结构可以把细胞内液与细胞外液分隔开，有效的防止胞外冰晶向胞内生长，保持细胞的过冷却状态，如梨的花芽（Ashworth，1982）和葡萄的芽心（Jones 等，2000）。存在机械损伤的种子容易被冻死，是因为这样的结构被破坏，不能有效的阻止冰晶向器官内部生长，导致胞内结冰而造成的（Keefe 和 Moore，1981）。

细心的观察者还发现，严冬季节活植物体内会发生结冰现象，但冰晶只出现在细胞间质，细胞质内并没有冰晶。这是因为细胞质内溶解了许多的可溶性物质，导致细胞质的结冰温度远低于细胞间质的结冰温度，因此在降温过程中，细胞间质先结冰，胞间质结冰后细胞间的水汽压降低，于是细胞内的水分向细胞间质移动，细胞质的可溶性物质浓度逐渐增高，进一步降低细胞质的过冷却点，细胞质继续保持过冷却状态，这一过程称为冷冻脱水。细胞外结冰虽然可能通过冰压、冰冻窒息和冰冻脱水等次生胁变对植物产生间接伤害，但常常是非致命的，其伤害程度远不及因细胞内结冰造成的伤害严重，因此温带植物能够经受低温的考验正是因为冰冻脱水和过冷却这两个机制在发挥作用。这也正是传统的超低温保存方法的工作原理。

超低温保存的传统方法（二步法）保存植物材料的基本步骤是添加低温保护物质，采用慢速降温，诱导细胞外结冰，通过冰冻脱水降低原生质的含水量，原生质过冷却，然后迅速转入液氮中，为此，超低温保存过程中降温的速度是个关键。Mazur 等（1972）根据中国仓鼠组织培养

细胞的超低温保存研究首次提出了冷冻伤害的二因素假说，该学说认为，冷冻伤害来自两个独立的因素：一是胞内冰伤害（intracellar ice damage），这是由于降温速度过快导致细胞内冰晶生成，破坏了细胞的膜系统引起的，因此，冷冻速度越快，此种伤害越大；另一个是溶质伤害（solute damage）或称溶液伤害（solution damage），这是由于降温速度太慢造成的。如前所述，降温会引起细胞冷冻脱水和过冷却，细胞质内的水分向细胞间质移动，细胞质的可溶性物质浓度逐渐增高。但细胞质浓度过高对细胞有是害的，特别是盐浓度过高会导致蛋白凝聚、变性。降温速度越慢，细胞在高浓度盐溶液中暴露的时间就越长，这种伤害也就越大。由于受这两种因素的共同作用，必然存在着一个最佳冷冻速度，对应于超低温保存的最高存活率，因此降温速度与冻存细胞的存活率之间是一条倒 U 型曲线（Karlsson 和 Toner，2000）。

可见，控制降温速度实际上还是调节细胞的水分含量，其作用效果跟温带植物在寒冷天气来临前降低体内水分含量是一样的。一定限度的脱水是必需的，但过度脱水又会导致脱水伤害。这说明，细胞内的水分至少有两种存在形式，一种是可冻结的，一种是不可冻结的，称为可冻结水和不可冻结水，需要脱除的只是可冻结的部分。

示差热分析（Differential Thermal Analysis，DTA）和后来使用更多的示差扫描量热技术（Differential Scanning Carolemeter，DSC）是研究种子水分存在状态的重要手段。该方法的基本原理是通过样品在降温过程或升温过程中放热峰或吸热峰出现时的温度范围判断样品内水分的状态变化。Vertucci 等（1991）研究了 *Landolphia kirkii* 胚轴低温处理过程中生命力与 DSC 放热峰的关系，发现在 0℃附近的一个放热峰跟该植物胚轴的生命力有关，这个放热峰出现胚轴就冻死，不出现胚轴就存活。Pritchard 和 Manger（1998）使用该方法研究了欧亚栎胚轴脱水过程中水分变化与脱水胁迫的关系，发现对应于两种状态的水分存在有两种类型的脱水伤害，一个是随着自由水移除产生的时间依赖性的、潜在可修复的伤害，接下来是一个因结合水移除产生的不可修复的伤害。Vertucci（1989a）通过对豌豆和大豆子叶的水热特性研究，认为种子水分至少有 5 个不同的存在状态。另外，核磁共振技术也可以用来检测种子内部水分的存在状态，姜孝成等（1996）用该方法检测出了正常性种子和顽拗性种子在脱水过程中水分状态变化的显著差别。

温带植物为了适应低温还普遍表现出细胞内可溶性糖浓度上升的现象，而且可溶性糖浓度的变化与植物的低温耐性呈显著的正相关，这说明可溶性糖是植物体内的保护性物质。海藻糖被认为是可溶性糖中保护效果最好的植物体内保护性物质，对植物抗御低温和脱水胁迫都有益处，在低等植物中广泛存在，但在高等植物体内通常缺少海藻糖。而具有类似功能的、又在高等植物体内广泛存在的可溶性糖类是蔗糖。在超低温保存过程中使用蔗糖预培养也可以提高材料的超低温耐性。关于可溶性糖保护作用的机理，存在水分替代假说和玻璃化假说两种解释。糖替代假说认为，糖类可以替代膜磷脂和蛋白极性基团周围的水分，通过与这些极性基团发生氢键键合保持这些大分子在无水状态下结构完整，保持膜和蛋白具有类似水合状态下的物理结构。而玻璃化假说认为，糖类能够提高溶液的粘滞度，促进玻璃态的形成，并由此保持膜和蛋白的结构稳定。实际上，这两方面的作用并不是互相排斥的，在冷冻和脱水的材料中这两方面的作用都可能存在。

耐寒植物的抗冻行为研究给了低温生物学灵感。受此启发在超低温保存过程中通过添加高浓度的低温保护物质，提高细胞质的溶液浓度，可以改变水分的结合状态，防止其在低温条件下形成冰晶。玻璃化法正是基于这个原理。玻璃化是指液态物质在降温过程中由于粘度极度增加而呈无定型态固化，而非结晶态固化。在玻璃化过程中，溶液被认为是变成了玻璃态物质，分子的线性运动显著降低，生物时间被有效中止，而不引起其他的改变（Fahy 等，1984）。玻璃态是普遍存在的自然现象，在脱水后的玉米胚中就观察到了玻璃态（Williams 和 Leopold，1989；Sun 和 Leopold，1994）。但常规溶液要实现玻璃化需要具有很高的浓度并降低到很低的温度（这些都可以提高溶液的粘度），而且需要有很快的降温速度，因为在快速降温过程中水分子来不及按晶体规律排列，也就不能形成冰晶。

因此，植物的超低温耐性与其脱水耐性、过冷却能力和玻璃化能力密切相关，而这些又都与植物体内的水分状态和保护性物质的含量是分不开的。在植物细胞中，这样的保护性物质主要是可溶性糖和可溶性蛋白。因为超低温保存与脱水密切相关，降温会导致冷冻脱水，或者超低温保存前就要进行材料的脱水处理，因此凡能增强脱水耐性的化学物质也都同时具有增强超低温耐性的功能，如可溶性糖、胚胎发育后期丰富蛋白（Lea 蛋白）。可溶性糖，特别是单糖，如蔗糖和棉子糖，除能通过提高植物的脱水耐性来增强植物的低温耐性外，还通过降低过冷却点和增强玻璃化能力，提高植物的低温耐性。植物体内的各种可溶性蛋白，包括热稳定蛋白和 Lea 蛋白，也都有利于低温耐性的提高。

抗冻蛋白（antifreeze proteins）是一类功能特殊的蛋白，最初发现于南极生长的鱼类血液中。这些鱼类在平均结冰温度为-1.9℃的海水中完成生活周期，这一温度比典型的海洋鱼类体液的结冰温度还要低约1℃，因此表现出明显的低温耐性。后来在南、北半球极地和近极地的多种鱼类、昆虫、蜘蛛、蜈蚣、螨类和植物体内都发现了抗冻蛋白。这些抗冻蛋白结构多样，不具有同源性，抗冻效果相差极大，但都能够在不改变融化温度的同时把结冰温度降低到融化温度以下0.5~1.0℃，这种现象称为“热迟滞”（thermal hysteresis）。抗冻蛋白的作用机理目前还不是很清楚，一般认为，抗冻蛋白能够有选择性地与冰晶的表面接合，吸附在冰晶上，阻止冰晶沿着棱柱侧面的生长，但容许冰晶沿着基面有限的生长。因此，在有抗冻蛋白存在的情况下，冰晶只能长成“针刺状”，降低了冰晶的大小和生长速度，并以非依数性的方式迟滞水溶液的冰点。

在细胞水平上，超低温耐性与细胞的类型、细胞膜透性和细胞的生理状态有关。例如，植物的分生组织细胞，因为具有个体小、胞质浓、液泡少、核/质比高的特点，具有较高的超低温耐性。而悬浮细胞超低温保存的实验表明，处于指数增长期的细胞超低温处理后存活率最高（Withers 和 Street，1977；Sala 等，1979）。在器官和个体水平上，超低温耐性与个体的大小、组织构成、发育情况、水合状态有关。一般说来，较小的个体由于细胞组成均一又便于调控含水量，在升/降温过程中受热均匀，因此冻融处理后存活率较高。温带植物的一些特殊结构有利于实现过冷却，保护植物的一些重要器官免受冻害，如桃的花芽（Ashworth，1982）、葡萄的芽心（Jones 等，2000）、莴苣瘦果的果壳（Keefe 和 Moore，1981）。

植物营养器官的低温耐性是动态变化着的，从秋到冬有一个低温耐性逐步获得和提高的过程，从冬到春又是一个低温耐性逐渐丧失的过程。同时，在植物低温耐性变化的过程中，植物体内保护性物质的含量，如可溶性糖和可溶性蛋白，也发生着相应的变化（Siminovitch 和 Briggs，1949；Guy 和 Haskell，1987；Koster 和 Lynch，1992；Arora 等，1992）。一个常见的现象是，许多越冬作物可以经受严冬的低温考验，但却常常被突如其来的早霜冻死，或是被严冬过后的倒春寒冻死。Sakai（1965）研究了温带植物低温驯化与小枝超低温保存后存活率的关系，发现不同的物种超低温保存需要的有效预冷温度不一样，而且同一种植物的有效预冷温度跟低温锻炼的程度有关。没有经过低温锻炼的或低温锻炼不完全的植株，需要预冷到更低的温度，投入液氮后才能存活；而经过低温锻炼后的植株，只需要初步预冷就可以投入液氮并存活。

与植物营养体低温耐性的获得与丧失类似，种子的超低温耐性也是变化着的。在顽拗性种子的超低温保存方面，很多学者都指出种子和胚的发育状态会影响冷冻后的生命力，强调要选用合适阶段的个体作为超低温保存的材料。Abdelnour-Esquivel 等（1992）选用3个发育阶段的咖啡（*Coffea* spp.）种子做胚的超低温保存，发现从中间发育阶段的种子中取出来的胚具有更高的超低温耐性。经过部分脱水并使用低温保护剂处理后，未完全成熟的菠萝蜜胚轴可以使用慢速冷冻的方法成功实现超低温保存，而使用相同的方案却不能成功保存完全成熟的菠萝蜜胚轴（Thammasiri，1999；Krishnapillay，2000）。类似的情况也出现在椰子离体胚的超低温保存研究中（Assy-Bah 和 Engelmann，1992a，b）。笔者分别以玉米胚和蒲葵胚为材料研究种子发育过程中超低温耐性的获得，发现发育早期的玉米胚缺少超

低温耐性，不论在什么水分状态胚经过冻融处理后都无一存活，发育中期的胚具有了有限的超低温耐性，在一个很窄的含水量范围内玉米胚可以经受超低温处理并存活，随着种子的发育，这一含水量范围逐渐扩大，到最大并保存到种子成熟。蒲葵胚的超低温耐性也是随着种子的发育逐步获得的，但最大的超低温耐性出现在种子发育的中间阶段，种子成熟时胚的超低温耐性又逐渐降低（Wen 和 Song，2007a，b）。

植物的超低温耐性是可以诱导的，低温预处理、渗透胁迫处理、ABA 预培养处理和蔗糖预培养处理都可以诱导植物超低温耐性的表达和提高（Bagniol 和 Engelmann，1991；Reed，1998）。未成熟的春小麦合子胚经 ABA 预培养 1 ~3 周后，使用二步法超低温保存，78% ~100% 存活，而对照的存活率均在 20% 以下（Kendall 等，1993）；油棕的体细胞胚使用 0. 75 mol · L^{-1} 蔗糖预培养 7 d 后，再用脱水法超低温保存可以获得成功（Dumet 等，1993）；龙胆（*Gentian scabra*）的腋芽（Suzuki，1998）、咖啡的体细胞胚（Hatanaka 等，1994），经过梯度蔗糖预培养后，可以成功的被超低温保存。很多植物的悬浮培养细胞在经过高渗透预培养后，如溶液中添加甘露糖醇、蔗糖、氨基酸等，表现出抗冻性提高，超低温保存后存活率上升。Pritchard 等（1986a，b，c）研究了渗透培养对细胞生长和超低温保存的影响，在糖槭（*Acer pseudoplatanus*）的细胞悬浮培养液中分别添加 6% 的甘露糖醇或山梨糖醇，提高培养液的渗透势。与对照相比，在高渗透培养液中细胞分裂次数变少，细胞伸长生长减小，细胞体积小而液泡少，壁薄质浓，超低温保存后存活率提高。此外，低温驯化、低温锻炼和 ABA 预培养等都同样能导致细胞分裂减少，胞内溶质积累，液胞缩小，而这些正是植物超低温耐性增强的生理学基础。但同样用高渗透预培养的大豆悬浮细胞却没有发生这样的形态变化，也就没有表现出超低温耐性的提高（Pritchard 等，1986a，b，c）。

4　超低温伤害的研究

Mazur 等（1972）的二因素假说很好地解释了冷冻过程中超低温伤害的发生。然而，一个完整的超低温保存方案通常包括植株的调理、材料的预处理、降温、贮藏、解冻、融后处理和恢复生长等几个阶段，在任何一个阶段由于选用的方法不适或操作不当都可能伤害实验样品并导致死亡。在超低温保存过程中，植物材料经常遭受的胁迫和伤害主要有如下几种类型：1）代谢胁迫　冷冻前的脱水处理和玻璃化溶液处理，都需要把待保存材料置于亚适宜生长条件下，可能会导致对低温和/或脱水敏感的材料代谢不平衡，积累有害的代谢产物，造成代谢胁迫；2）脱水胁迫　冷冻前的脱水处理、玻璃化处理和慢速冷冻过程中的冷冻脱水，都有可能会造成材料过度脱水，从而引起细胞收缩、变形，细胞内外液溶质浓度升高，pH 值发生变化，胞内生化环境恶化；3）结冰伤害　在冷冻过程中因为降温速度太快，或者解冻过程中因为升温太慢而出现脱玻璃化，会导致细胞内冰晶形成，原生质各组分之间发生分割，并伤害质膜和细胞器；4）化学毒害　长时间高浓度玻璃化溶液处理和因失水导致的细胞内盐浓度升高，可能会引起蛋白质凝聚、变性，对细胞产生化学毒害；5）机械损伤　冷冻前的材料脱水和解冻后的细胞吸水可能会导致细胞体积剧烈变化和质壁分离，对细胞产生机械损害，胞外结冰产生的大块冰晶对细胞的挤压，还有大块材料在冻融过程中因受热不均衡也可能产生机械伤害；6）油体损伤　油料植物的种子在超低温保存过程中容易因为油体破裂导致生命力丧失。这些胁迫和伤害过程并不是相互割裂的，常常是互为因果，伴随出现的。

顽拗性种子因为对脱水高度敏感，常常在自由水被脱除前就丧失了生命力，这类种子冷冻前脱水不够会招致结冰伤害，脱水过多又会造成脱水伤害，超低温保存非常困难。Hor 等（1990）认为存在一个临界含水量（下限）和一个最高冻结含水量（上限），含水量高于最高冻结含水量的种子遇到零下低温会因胞内结冰遭受伤害，把种子脱水到临界含水量以下则会导致脱水伤害。正常性种子因为最高冻结含水量较高且临界含水量较低，二者之间存在一个“窗口”，因此只要充分干燥就可以顺利实现超低温保存。顽拗性种子和中间型种子则没有这样一个含水量“窗口”或“窗口”很小，因此一般不能耐受零

下低温。但采用快速脱水的方法（flash drying）可以让材料在短时间内降低含水量，减少因水分丧失引起的代谢胁迫伤害，把材料脱水到比较低的含水量而保存比较高的活力，实际上是降低了种子的临界含水量（下限），有可能成功实现超低温保存或提高超低温保存后的存活率。

一般认为，正常性种子因为耐脱水，在最高冻结含水量和临界含水量之间存在一个比较宽的“窗口”，可以在冷冻前把自由水安全的移除，超低温保存比较容易取得成功，但也有例外。金合欢等硬实种子在超低温保存过程中常常因为受热不均匀遭致机械伤害，种子破裂并伤害到胚而影响萌发。富含油脂的正常性种子（油料植物种子），虽然具有很高的脱水耐性，但在快速冷冻的情况下，很容易遭受超低温伤害，如芝麻（Stanwood，1987）、大豆和向日葵（Vertucci，1989b）。这是因为油料种子贮油体与水分的相互作用会促进大冰晶的形成，导致电解质泄露（Vertucci，1989a），称作油脂丰富种子对冷冻速率的敏感性。油棕、咖啡、柑橘等中间型种子具有一定程度的脱水耐性，但在超低温保存过程中容易因为过度脱水而死亡。油棕种仁在冷冻前把含水量从6%回升到30%（以干重为基础），可以提高超低温保存后的存活率（Engelmann等，1995），柑橘类种子冷冻前先在25℃和75%～80%的相对湿度下平衡水分，然后再进行超低温保存，融后存活率最高（Hor等，2005）。

顽拗性种子易于招致超低温伤害很大程度上源于其细胞保持活跃的生长状态，具有丰富的线粒体、内膜系统和大的液胞而缺少脂肪体、蛋白体和淀粉粒这样一些特点。跟动物细胞不同的是，植物细胞通常具有细胞壁和液泡。液泡的主要内容物质是水，冷冻过程中很容易结冰引起伤害，是导致超低温保存失败的主要方面；而细胞壁的存在容易引起植物细胞在冻融过程中发生机械伤害，是导致超低温保存失败的另一重要原因（Tao等，1983）。胞内结冰是造成超低温保存过程中细胞死亡的主要原因（Maurze，1984），这不仅可能会出现在材料的降温阶段，也可能出现在材料的升温阶段。从大约-3℃到-50℃的温度范围是冰晶生长最容易发生的区间，称为超低温伤害的“危险温度区”，含有自由水的材料在快速冷冻过程中通过这一温度区间时细胞内部可能因为同核结晶形成微小的冰晶。这些冰晶本身并不会对细胞造成伤害，但如果解冻时升温速度太慢，更多的自由水以这些微小冰晶为结晶核发生重结晶，导致冰晶长大，就会对细胞造成伤害（Sakai，1966）。采用快速解冻法，把材料从液氮中取出来立即投入37℃的水浴中并不断搅拌，使材料以120℃/min的升温速度快速通过危险温度区，就可以有效地避免重结晶的发生。但大块材料使用快速升温又可能会因为受热不均匀造成机械伤害。

伤害发生的原动力和位点是超低温伤害机理研究需要阐明的主要内容。蛋白质变性可能是植物冷冻伤害的重要方面。植物冻害和抗冻耐性的巯基-二硫键假说认为，蛋白质分子中包含有较多的硫氢键是蛋白质变性和植物冻害发生的主要原因。在低温条件下，蛋白质分子间的两分子硫氢键被氧化脱氢，形成一分子的二硫键，使蛋白质发生结构变化，凝聚，功能丧失（Levitt，1962）。众多的研究发现，植物细胞在冻害发生后，单位蛋白含有的硫氢键减少了，而二硫键增多了，说明冷冻导致二硫键的形成。低温锻炼可以诱导不含硫氢键的蛋白大量合成，而含硫氢键的蛋白合成较少，因此单位蛋白含有的硫氢键减少了，植物抗冻性就增强了（Morton，1969）。

与超低温保存相关的伤害还可能发生在材料的融后阶段，这其中最常见的就是吸涨伤害。脱水和降温都可能会使细胞膜的脂质层发生相变，细胞膜从液晶态变成六角形的结构，这时候把种子播种到富含自由水的基质上萌发或是把胚接种到培养基上恢复生长，特别是当含水量降得很低的材料在低温下快速吸水的时候，就容易产生吸涨伤害，电解质大量泄漏，因为这样的条件下快速复水会阻止细胞膜正确的重组为层状相（Shivanna和Heslop-Harrison，1981；Woodstock和Tao，1981）。超低温保存过的咖啡种子，极易于因为吸涨性的膜伤害导致生命力丧失，但只要先在37℃和水饱和的湿空气中预吸湿24 h，就可以有效的防止伤害发生（Dussert等，2003），说明这样的处理有利于受伤膜的修复，恢复细胞膜的流动性和透过性。另外，前面介绍的低温驯化和蔗糖预培养等诱导和提高植物低温耐性的各种

方法，也都跟这些方法能够改善细胞膜的性状有关。例如，低温驯化导致细胞膜的蛋白和脂类在总量和组成方面都发生改变（Uemura 和 Yoshida，1984；Lynch 和 Steponkus，1987）。

细胞质膜和各种细胞器膜是最容易受到伤害的位点（Steponkus，1984）。植物细胞膜是由磷脂和蛋白质构成的，具有流动镶嵌结构，这种特殊结构使得细胞膜脂有很好的流动性，在把原生质与外界环境分隔开的同时，又通过扩散、主动运输的方式把细胞内外环境联系起来。在脱水和低温的胁迫下，植物细胞膜从液晶态转变为凝胶态，膜收缩，出现裂缝或者通道。这一方面使膜的透性增大，细胞内溶物外渗；另一方面使膜结合酶系统受到破坏，酶活性下降，膜结合酶系统与非膜结合酶系统的平衡丧失。于是细胞代谢紊乱，有害中间代谢产物积累，细胞受害和死亡。

测量冻融处理后细胞电解质的泄漏是了解超低温保存过程中植物细胞遭受超低温伤害的重要方法。植物细胞质中溶解有很多带电荷的水溶性的颗粒，如果细胞膜的完整性或是膜透性受到伤害就会导致膜的选择性透过功能受损，细胞吸涨时胞内电解质外漏，溶液的电导率明显升高。因此，浸出液的电导率与细胞膜受损伤程度呈正相关。超低温保存过程中因为细胞膜受伤害导致电解质外漏是很普遍的现象（Gusta 等，1982；Fujikawa，1995；郑郁善等，2001）。

细胞显微和超显微结构的观察是一种直接观察超低温伤害的有效方法，在超低温伤害的研究中很常用（Zavala 和 FInkle，1983；Jensen 和 Oettmeier，1984；Mari 等，1995）。Berjak 等（1999）利用细胞显微技术比较了两个不成功方案和一个成功方案在保存欧亚栎胚轴过程中细胞结构方面遭受的伤害，发现胁迫伤害是积累的，冷冻前过于严格的表面灭菌和长时间脱水本身也许并不是致命的伤害，但再跟冷冻胁迫结合在一起的时候就成为致命的伤害了。Sakai 和 Otsuka（1967）观察到超低温伤害跟结冰事件的关系，冻融处理后死亡的样品在电子显微镜下可见冰晶融化后留下的空洞。Isaacs 和 Mycock（1999）研究了玉米种子吸涨处理和超低温伤害的关系，发现冷冻前吸水仅导致轻微冷冻伤害的发生，但当线粒体内重新发育出嵴并恢复活跃代谢的时候严重的超低温伤害就明显可见了。Wang 等（1998）通过对水稻胚性悬浮细胞玻璃化法超低温保存的研究发现，细胞结构的伤害主要发生在冷冻处理前的玻璃化溶液处理过程中，冻融处理并没有导致更多的细胞形态变化。另外，可以使用低温显微镜观察超低温保存过程中冰晶形成的动态过程。

如果膜透性的变化和细胞结构变化表现的主要是超低温保存过程中的原初伤害，则抗氧化酶分析研究的主要是超低温保存过程中的次生伤害。活性氧伤害可能是超低温伤害的一个重要方面。低温胁迫和冻/融处理一方面会诱导细胞的活性氧防御体系发生改变，导致抗氧化酶系统的有效运转受到抑制或功能受到损害（Lee 和 Lee，2000），另一方面，会促进自由基的产生（Benson，1988），加速细胞内有害代谢产物的积累（Fleck 等，1999），从而活性氧伤害的发生就不可避免了。蛋白质、核酸、质膜都可能成为活性氧攻击的目标。超低温保存中的活性氧伤害具有随时间推移逐渐加重和累积的特点，如超低温保存的 neem 种子（Varghese 和 Naithani，2008）。

与对照相比，超低温保存后的材料一般恢复生长比较缓慢，说明存在着一个修复超低温伤害的过程。有时在解冻后和恢复生长前使用一些特定的方法可以促进超低温伤害的修复，提高种子活力。使用渗调处理和预吸湿处理预防吸涨伤害的过程中就存在超低温伤害的修复，在这个过程中，不仅受损伤的膜功能被修复，抗氧化酶恢复有效的运转，而且受损伤的 rRNA 被替换，蛋白质和 DNA 的伤害也可以被修复，从而提高冻融后种子的活力；一些植物的胚在经过超低温保存后对恢复生长培养基有了新的要求，如未成熟的咖啡胚经超低温保存后仅有一半存活，但若在恢复生长培养基中添加 GA_3，存活率可以提高到 80% 以上（Abdelnour-Esquivel 等，1992）；胚和胚轴在经过冻融处理后活性氧防御系统功能都会有所降低，因此恢复生长的初期都需要一段时间的暗培养以避免光氧化伤害，待活性氧防御系统功能恢复到正常状态后就可以在常规条件下培养了；还有，一些植物的胚或胚轴在经过超低温保存后丧失了向地性，需要用含钙镁离子的溶液处理以重建细胞骨架（Berjak 和 Mycock，2004）。

5 植物超低温保存的常用方法

如前所述，一个完整的超低温保存过程通常包括植株的调理、材料的预处理、降温、贮存、解冻、融后处理、恢复生长等几个阶段，每一个阶段又可以使用不同的技术和方法，各种预处理和冻、融方式的具体操作方法可以参考有关文献（文彬和宋松泉，2005a，b）。实际上，这些方法和技术是可以互相借用和组合的，从而成为不同的超低温保存方案。不同物种的超低温保存需要使用不同的方案。每一个研究者为每一种材料设计的超低温保存方案都是各具特色的，但为了学术交流的方便，还是需要根据超低温保存过程中材料的预处理和冻、融等几个关键步骤所使用具体方法的特点，定义一些基本的超低温保存方法。需要说明的是，不论使用哪一种超低温保存方法，做好材料的调理这一步对超低温保存的成功至关重要。材料的调理是指选用健康、无病虫害的植株并将材料调整到最适合超低温保存的生理状态。在此仅把几种常用的超低温保存方法的基本原理及应用情况做一个简单的介绍：

5.1 传统的二步冷冻法

二步冷冻法是在 Polge 等（1949）成功保存动物精子的基础上发展起来的。先使用低温保护剂对保存材料进行预处理，再用程序降温仪以 0.1～1.0℃/min 的速度把待保存材料降温至 -30℃～-40℃，有时需要人工诱导胞外结冰，并在此温度下保持一段时间，然后投入液氮。第一步降温是慢速降温，降温的速度很重要，各种植物材料的最佳降温速度很不相同，在细胞水平上，这主要是由细胞膜的透水性能所决定，而在器官水平上则取决于植物完成低温驯化的程度。该方法的主要原理是，通过第一步慢速降温促进细胞冷冻脱水和过冷却，脱除细胞内的可冻结水，以防止第二步快速降温时造成伤害。低温保护剂作用的确切机理仍然不很清楚，这类物质具有一定的渗透调节作用，可以引起细胞脱水，还可能具有保护细胞膜和酶结合位点免受冻害的作用。常用的低温保护剂有甘油、甘露醇、二甲亚砜等。

5.2 简化的二步冷冻法

传统的二步冷冻法因为需要使用程序降温仪等昂贵设备，其广泛应用受到了严重的限制，人们想出其它办法来解决这一难题。实践中，有时可以使用家用冰箱的冷冻室（-20℃），把添加了低温保护剂的待保存材料放入冷冻室降温到 -20℃并保持一段时间，然后投入液氮中，某些材料可以用这种方法降温并取得了不错的保存效果。有研究者通过使用具有不同隔热性能的容器装载待保存材料来调节投入液氮后的降温速度，还有的通过在盛装待保存材料的容器外套上不同厚度的泡沫隔热层来调节投入液氮后的降温速度（Finkle 等，1974）。另外，Nalgene 公司设计了一种程序降温盒 Mr Forsty，盒中灌满异丙醇，装好待保存材料后把程序降温盒放进 -70℃深低温冰箱中约 6 h，就可以使待保存材料以接近 1.0℃/min 的速度降温到 -40℃，然后投入液氮中，对一些材料的超低温保存很有效。

5.3 微滴法

该方法是在超低温保存木薯（*Manihot esculenta*）的分生组织过程中首先创造出来的（Kartha 等，1982）。方法是先把低温保护剂滴到铝箔条上形成 2～3 μL 的微滴，然后把待保存材料放置到微滴之中，把铝箔连同微滴一起送入程序降温仪的冷冻室，按一定的速度降温到 -20℃～-40℃，然后投入液氮中。该方法的主要优点是使用极少量的低温保护剂，并利用铝箔良好的导热性能，以提高待保存材料降/升温的均匀一致，减少因为材料降温速度不均匀而造成的伤害。另外，也有用微细玻璃管、金属环等代替铝箔条进行微滴法超低温保存的，原理基本一致。

5.4 脱水法

该方法的原理是在冷冻前先用人工的方法把待保存材料中的自由水脱除，以防止冷冻过程中结冰对细胞造成伤害。耐脱水的种子对脱水速率没有要求，但顽拗性种子则需要快速脱水，而且常常是用胚或胚轴做超低温保存的目标材料。快速脱水可以通过活化硅胶吸除水分或通过无菌气流带走水分来实现。在顽拗性/中间型种子方面，Grout 等（1983）首先使用这一方法保存了油棕的胚，后来这一方法又被用来成功的保存了许多植物，如咖啡（Abdelnour-Esquivel 等，1992）、蒲葵（Wen 和 Song，2007b）等。有一些植物的种子和孢子，不需要经过脱水处理就可以直接投入液氮中并成功的实现超低温保存，如前文所述

的超低温保存的早期试验（Selby，1901；Lipman 和 Lewis，1934；Lipman，1936），实际上也可以归入到脱水法中来，只是这些材料本身的含水量很低，省去了人工脱水的过程，或者说材料的水分是被自然脱去的而不是人工脱去的，因而可称做直冷法。

5.5　包埋法和包埋脱水法

包埋法是借用人工种子的技术发展起来的，其主要步骤是在冷冻前先把待保存材料悬浮在含有高浓度的甘油、蔗糖的海藻酸钠溶液中，然后用滴管把待保存材料滴到含有相同浓度的甘油、蔗糖的氯化钙溶液中，静置一段时间让海藻酸钙螯合和固化，在待保存材料表面形成一个包裹层，成为包埋珠。在包埋处理的过程中，因为渗透脱水等原因待保存材料的低温耐性有一定的提高，同时材料外的包裹层又具有一定的保护作用，可以减轻接下来的脱水、玻璃化及冷冻处理对材料的伤害。包埋珠经吸干表面水分后，可以直接用于冷冻保存，如烟草悬浮细胞（Kobayashi，2005），但是更多的材料在包埋后还需要经过进一步脱水或玻璃化处理才能实施冷冻保存，具体情况依种而定。*Solanum phureja*（Fabre 和 Dereuddre，1990）、梨（Dereuddre 等，1990）、葡萄（Plessis 等，1991）的茎尖和胡萝卜的体细胞胚（Dereuddre 等，1991a，b）是最早用包埋脱水法成功超低温保存的材料。目前，文献报道使用该方法成功实现超低温保存的植物材料有近百种（Gonzalez-Arnao 和 Engelmann，2006）。

5.6　玻璃化法、包埋玻璃化法和微滴玻璃化法

玻璃化是指液相物质被过冷却到深低温，在冷冻过程中不出现结晶现象，并最终固化成无定形的玻璃样状态的过程。玻璃化法的原理是利用高浓度的玻璃化溶液处理待保存材料，玻璃化溶液中有些成分可以引起细胞脱水，有些成分可以渗透进入原生质，从而极大的提高了原生质的粘滞程度，因此在接下来的快速降温过程中细胞内的水分子来不及按冰晶方式排列而呈玻璃态，或只能形成极微小的冰晶，避免对细胞造成伤害。该方法起源于动物学方面的超低温保存，小鼠胚最早报道用玻璃化法成功实现了超低温保存（Rall 和 Fahy，1985），使用的玻璃化溶液称为 VS1，但 VS1 在植物材料的超低温保存中效果很不好，植物材料超低温保存中常用的玻璃化溶液是 PVS1、PVS2 和 PVS3。文献记载使用玻璃化法成功超低温保存的植物有 130 余种（Sakai 和 Engelmann，2007），绝大多数都是使用 PVS2。包埋玻璃化法是先把材料包埋成海藻酸钙的小珠，然后按玻璃化法的程序处理。到目前已有 10 多种植物材料用该方法成功实现了超低温保存（Sakai 和 Engelmann，2007），其中山葵的顶端分生组织是最先使用这一方法的例子（Matsumoto 等，1995）。微滴玻璃化法是结合了玻璃化法和微滴法的技术，待保存材料先用玻璃化溶液处理，然后单个放到铝箔片上的玻璃化溶液微滴中，投入液氮快速冷冻，因为表面张力的作用，操作过程中微滴并不会从铝箔条上滑落。该方法是近些年创造出来的，目前用该法保存的植物材料也有 10 多种（Sakai 和 Engelmann，2007）。

虽然植物种质资源超低温保存的方法多种多样，但经验告诉我们，并不是这些方法对每一种材料都适用。对一个具体的植物样品而言，采用哪一种方法能够实现超低温保存，通过怎样的预处理和融后处理能够提高超低温保存后的存活率，不能一概而论，需要根据材料的具体情况而定。实际上，任何一种材料都只能通过试验才有可能摸索出适合的超低温保存方案。超低温保存的总体方向是，在追求更好的超低温保存结果的同时，力图使超低温保存实验重复性好、操作简单、省时省事省钱。

6　顽拗性种质资源超低温保存的现状与展望

Roberts（1973）定义了顽拗性种子（recalcitrant seeds），并预言超低温保存是唯一的和最有希望能够长期保存顽拗性种子的方法（Roberts，1975）。在目睹了长期保存顽拗性种子的许多努力终归失败，而顽拗性种子的超低温保存不断取得进展之后，越来越多的人认同超低温保存是顽拗性种子长期保存唯一和最有希望的方法（King 和 Roberts，1979；Roberts 等，1984；Chin，1989；Berjak 和 Pammenter，2001，2004；Pritchard 和 Dickie，2003；Engelmann，2000，2004；Hor 等，2005）。但顽拗性种子的超低温保存还有很大的难度，仍然处在试验和摸索阶段。目前，顽

拗性种子依然是植物种质资源超低温保存需要研究的重点和难点。

尽管提出顽拗性种子的概念已经有30多年，提出用超低温方法保存顽拗性种子也有30多年，而且超低温保存是顽拗性种子长期贮藏的唯一和最有希望的方法已经成为广泛的共识，但目前顽拗性种子超低温保存的技术和方法还很不成熟，成功的例子也不多。在顽拗性种子超低温保存的实验中，经验和机遇有着很重要的作用，失败的事例要远多于成功的事例，即便是在超低温保存的方法和技术确定之后，材料的选择、处理的把握等仍然可以决定实验是成功还是失败（Krishnapillay，2000；Panis 等，2005）。对同一种材料使用同一种方法进行超低温保存，不同的实验室得出不同的结果，这样的事例很多，如 Kartha 等（1982）、Reed 等（2001）、Panis 等（2005）等。成功的超低温保存至少应该以材料解冻之后能够恢复生长成苗为标准，但在很多研究中还只能得到愈伤组织或不完全的幼苗。造成顽拗性种子超低温保存不成功的原因很多，如对材料的生物学特性缺乏了解，材料的生理状态不理想，或者超低温处理后材料恢复生长所需要的条件发生了变化等等。但更多的问题来自超低温冻融处理和种子顽拗性本身，例如，种子太大，含水量太高，对低温和脱水敏感等等。

关于顽拗性种质资源的超低温保存，我们欣喜地看到，经过许多人的共同努力已经取得了一些重要的成果和进展。最初的实验发现咖啡种子超低温保存后不能存活（Becwar 等，1983），随着研究的深入，逐渐发现种子的含水量、冷冻方式、解冻速度和复水过程对咖啡种子的融后存活都有重要影响，在此基础上优化超低温保存方案，从而获得了满意的融后成苗率（Dussert 和 Engelmann，2006）。近30年来，伴随着每一个新思想的迸发和每一个新方法的诞生，都涌现一些顽拗性种质资源成功超低温保存的报道。同时，植物超低温耐性的机理逐渐清楚，已经可以通过一些手段诱导产生和提高某些植物的超低温耐性。超低温伤害的研究又让我们对超低温保存过程中伤害发生的原因有了越来越多的了解，为我们设计和优化超低温保存方案提供了理论依据。超低温保存研究中，可以通过对一些关键步骤技术指标的优化，包括超低温保存对象的选择，材料调理、预处理、冷冻、贮存、融冻、融后处理和恢复生长等的优化，提高超低温保存成功机率。植物细胞的液胞和细胞壁被认为是影响植物材料超低温保存的两个主要障碍，超低温保存过程中选用分化程度低的分生组织或指数生长期的悬浮培养细胞就可以比较好地避开液胞的不利影响，而选用原生质体作为超低温保存材料又可以避免细胞壁的不利影响，基于这样的思想，芒果（Wu 等，2003）、荔枝和龙眼（郭玉琼，2007）的超低温保存都获得了成功。另外，有一些生产顽拗性种子的植物，种子和胚的超低温保存都很困难，但花粉却是耐脱水的，可以成功实现超低温保存，如黄皮（陈佳瑛等，2007）。此外，一些在动物学和医学实验中被证明行之有效的技术还很少在顽拗性种子的超低温保存中试用。如动物学和医学实验中常常以只含有几个细胞的卵为材料并超低温保存成功；还有通过操纵锌离子浓度调控细胞膜上微孔的开关来调节细胞对低温保护物质的摄入；采用射入的方法把材料投入液氮提高冷冻过程中的降温速度；通过低压蒸发以降低液氮的温度来促进材料在降温过程中实现玻璃化等等。

同时，我们也清醒地看到，目前能够成功地超低温保存的顽拗性种子还非常有限，也还没有一个成熟的技术可以普遍适用于顽拗性种子的超低温保存，能够通过低温驯化、低温锻炼和各种预处理方法诱导产生和提高超低温耐性的主要是正常性种子、中间型种子和温带起源的顽拗性种子，而热带起源的典型的顽拗性种子很少有可以通过这些方法诱导产生超低温耐性的。另外，顽拗性种子在对低温和脱水敏感的同时，对低温保护剂、玻璃化溶液和各种诱导低温耐性的预处理也都很敏感。而且，热带起源的典型的顽拗性种子在组织培养方面也表现出很强的顽拗性，如龙脑香科植物，要想通过组织培养的方法脱分化产生愈伤组织也是件难事。这些现象不应该简单的理解为偶然的、孤立的事件，而很可能是与种子顽拗性联系在一起的，或者说就是种子顽拗性的一部分。因此，把使用正常性种子建立起来的各种提高超低温耐性的技术简单地搬到顽拗性种子的超低温保存中来，并期望获得跟正常性种

子超低温保存相似的成功，结果往往都是失败。

每年都有很多关于植物种质资源被成功超低温保存的报道，估计到目前已经有 800 ~ 1 000 种高等植物材料被成功地超低温保存（这个数字不包括被超低温保存的正常性种子），但其中属于热带植物的很少，生产顽拗性种子的植物也很少，生产顽拗性种子的热带植物就更少。原产于热带地区的、生产顽拗性种子的植物以种子或胚为对象保存成功的仅有南洋杉（Pritchard 和 Prendergast，1986）、菠萝蜜（Thammasiri，1999；Krishnapillay，2000）、椰子（Assy-Bah，Engelmann，1992a，b）、可可（Pence，1991a）、橡胶（Normah 等，1986）等少数几种（Engelmann，1991；Panis 等，1996；Hong 等，1996）。种子顽拗性是一种复合数量性状，是植物长期适应各自生活环境的结果，多样性的生境造就了多样性的顽拗性种子类型；不同植物的顽拗性种子具有各自不同的生物学特点，在顽拗性方面存在着质和量的差别（文彬，2008）。这就决定了顽拗性种子的超低温保存存在不同的难度，需要使用不同的方法，通过试验逐个摸索适合的超低温保存方案。经验告诉我们，对顽拗性种子的超低温保存应该持谨慎的乐观态度：中间型种子、“亚正常性种子”和“具有有限脱水耐性的正常性种子”的超低温保存比较容易取得成功，超低温保存胚或胚轴效果明显优于保存整粒种子，小粒种子整粒的保存比大粒种子容易，只要操作得当，大粒种子的整粒保存也是有可能的；顽拗性种子的超低温保存就要困难得多，而且热带起源的顽拗性种子比温带起源的难保存，热带起源的顽拗性种子以湿热生境中生长的种类最难保存，那些快速萌发的、脱水高度敏感的种类比具有休眠的、临界含水量低的种类更难保存，除少数种类外，顽拗性种子的保存都需要以离体胚或胚轴为保存对象，需要选择合适发育阶段的材料，精心设计超低温保存方案并谨慎操作方有可能成功。

〔参　考　文　献〕

宋淑云，晋齐鸣，张伟等，2005. 大豆花叶病毒超低温保存对毒力的影响［J］. 吉林农业科学，**30**：36—37

孙德兰，吴逸，孙龙华等，1988. 糜子愈伤组织的超低温保存及植株再生［J］. 植物学通报，**5**：236—239

孙龙华，简令成，曹孜义，1989. 玉米愈伤组织超低温保存的研究［J］. 植物学通报，**6**（1）：30—32

王君晖，郑泳，严庆丰等，1996a. 水稻胚性悬浮细胞的玻璃化法超低温保存和可育植株再生［J］. 科学通报，**41**（22）：2081—2084

文彬，宋松泉，2005a. 种子的超低温贮藏［A］. 见：宋松泉，程红焱，龙春林，姜孝成主编，种子生物学研究指南［M］. 科学出版社，145—148

文彬，宋松泉，2005b. 胚轴的超低温贮藏与离体再生［A］. 见：宋松泉，程红焱，龙春林，姜孝成主编，种子生物学研究指南［M］. 科学出版社，148—152

Abdelnour-Esquivel A，Villalobos V，Engelmann F，1992. Cryopreservation of zygotic embryos of *Coffea* spp.［J］. *CryoLetters*，**13**：297—302

Adams J，1905. The effect of very low temperature on moisture seeds［J］. *Scientific Proceedings of Royal Society*，Dublin **2**：1—6

Ai PF（艾鹏飞），Luo ZR（罗正荣），2003. Cryopreservation of dormant shoot-tips of persimmon by vitrification and plant regeneration［J］. *Scientia Agricultura Sinica*（中国农业科学），**36**：553—556

Ai PF（艾鹏飞），Luo ZR（罗正荣），2004. Cryopreservation of pollen of ‘Ze njimaru’ Persimmon（*Diospyros kaki* Thunb.）［J］. *Journal of Huazhong Agricultural*（华中农业大学学报），**23**：563—565

Arora R，Wisniewski ME，Scorza R，1992. Cold acclimation in genetically related（sibling）deciduous and evergreen peach（*Prunus persica* L. Batsch）. 1. Seasonal changes in cold hardiness and polypeptides of barkand xylem tissue［J］. *Plant Physiology*，**99**：1562—1568

Ashworth EN，1982. Properties of peach flower buds wich facilitate supercooling［J］. *Plant Physiology*，**70**：1475—1479

Assy-Bah B，Engelmann F，1992a. Cryopreservation of immature embryos of coconut［J］. *CryoLetters*，**13**：67—74

Assy-Bah B，Engelmann F，1992b. Cryopreservation of mature embryos of coconut and subsequent regeneration of plantlets［J］. *CryoLetters*，**13**：117—126

Bagniol S，Engelmann F，1991. Effects of pregrowth and freezing conditions on the resistence of meristems of date palm to freezing in liquid nitrogen［J］. *CryoLetters*，**12**：279—286

Becqoerel P，1905. Action de l'air liquide sur la vie de la graine［J］. *Comptes Rendus de l' Académie des Scences*，**140**：1652—1654

Becwar MR，Stanwood PC，Leonhardt KW，1983. Dehydration effects on freezing characteristics and survival in liquid nitrogen of desiccation-tolerant and desiccation-sensitive seeds［J］. *Journal of the American Society for Horticultural Science*，**108**：613—618

Benson EE，1988. Chemiluminescence in cryopreserved plant tissue culture：the possible involvement of singlet oxygen in cryoinjury

［J］. *CryoLetters*, **9**: 120—131

Berjak P, Mycock DJ, 2004. Calcium, with magnesium, is essential for normal seedling development from partially-dehydrated recalcitrant zygotic axes: a study on *Trichilia degeana* Sond. ［J］. *Seed Science Research*, **14**: 217—231

Berjak P, Pammenter NW, 2001. Seed recalcitrance——current perspectives ［J］. *South African Journal of Botany*, **67**: 79—89

Berjak P, Pammenter NW, 2004. Biotechnological aspects of non-orthodox seeds: an African perspective ［J］. *South African Journal of Botany*, **70**: 102—108

Berjak P, Walker M, Watt MP *et al.*, 1999. Experimental parameters underlying failure or success in plant germplasm cryopreservation: a case study on zygotic axes of *Quercus robur* L. ［J］. *CryoLetters*, **20**: 251—262

Boucaud M, Cambecedes J, 1988. The use of 1,2- propanediol for cryopreservation of recalcitrant seeds: the model case of *Zea mays* imbibed seeds ［J］. *CryoLetters*, **9**: 94—101

Brown DCW, Watson EM, Pechan PM, 1993. Induction of desiccation tolerance in microspore-derived embryos of *Brassica napus* ［J］. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, **29**: 113—118

Cai XN（蔡小宁）, Chen SF（陈舒泛）, Chen J（陈俊）*et al.*, 2004. Cryopreservation of *Chlorella vulgaris* by vitrification ［J］. *Plant Physiology Communications*（植物生理学通讯）, **40**: 599—601

Chandel KPS, Chaudhury R, Radhamani J *et al.*, 1995. Desiccation and freezing sensitivity in recalcitrant seeds of tea, cocoa and jackfruit ［J］. *Annals of Botany*, **76**: 443—450

Chen JY（陈佳瑛）, Zhang XM（张秀梅）, Chen WC（陈伟才）*et al.*, 2007. Cryopreservation of Wampee［*Clausena lansium*（Lour.）Skeels］pollens ［J］. *Chinese Journal of Tropical Crops*（热带作物学报）, **28**: 20—21

Chen PL（陈品良）, He SA（贺善安）, Jin W（金炜）, 1990. Cryopreservation of pollen from *Eucommia ulmoides* Oliv. and *Sinojackia xylocarpa* Hu. ［J］. *Journal of Integrative Plant Biology*（植物学报）, **32**: 288—291

Chin HF, Krishnapillay B, 1989. Cryogenic storage of some horticultural species ［J］. *Acta Horticulturae*, **253**: 107—112

Chin HF, 1989. Storage of recalcitrant seeds: past, present and future ［A］. In: Turnbull JW ed. *Tropical Tree Seed Research* ［M］. Proceedings of an International Workshop Help at the Forestry Training Centre, Gympie, Queensland, Australia, 21-24 August 1989. Canberra, 89—92

Dereuddre J, Blandin S, Hassen N, 1991a. Resistance of alginate-coated somatic embryos of carrot（*Daucus carota* L.）to desiccation and freezing in liquid: 1. Effects of preculture ［J］. *CryoLetters*, **12**: 125—134

Dereuddre J, Hassen N, Blandin S *et al.*, 1991b. Resistance of alginate-coated somatic embryos of carrot（*Daucus carota* L.）to desiccation and freezing in liquid: 2. Thermal nalysis ［J］. *CryoLetters*, **12**: 135—148

Dereuddre J, Scottez C, Arnaud Y *et al.*, 1990. Resistance of alginate-coated axillary shoot tip of pear tree（*Pyrus communis* L. cv Beurré Hardy）*in vitro* plantlets to dehydration and subsequent freezing in liquid nitrogen: effects of previous cold hardening ［J］. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciencs Paris*, *t.* 310, *SérieIII*, 317—323

Diettrich B, Popov AS, Pfeiffer B *et al.*, 1982. Cryopreservatio of *Digitalis lanata* cell cultures ［J］. *Planta Medica*, **46**: 82—87

Dumet D, Engelmann F, Chabrillange N *et al.*, 1993. Cryopreservation of oil palm（*Elaeis guineensis* Jacq.）somatic embryos involving a desiccation step ［J］. *Plant Cell Reports*, **12**: 352—355

Dussert S, Chabrillange N, Montillet J *et al.*, 2003. Basis of coffee seed sensitivity to liquid nitrogen exposure: oxidative stress or imbibitional damage? ［J］. *Physiologia Plantarum*, **119**: 534—543

Dussert S, Engelmann F, 2006. New determinants for tolerance of coffee（*Coffea arabica* L.）seeds to liquid nitrogen exposure ［J］. *CryoLetters*, **27**: 169—178

Engelmann F, 1991. Tropical plant germplasm conservation ［A］. In: Biotechnology for Tropical Crop Improvement in Latin America. Fourth Conference of the International Plant Biotechnology Network（IPBNet）. San Jose, Costa Rica. Jan, 14—18

Engelmann F, 2000. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources ［A］. In: Engelmann F, Takagi H eds, *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm. Current Research Progress and Application* ［M］. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsuksba, Japan/International Plant Genetic Research Institute, Rome, 8—20

Engelmann F, 2004. Plant cryopreservation: progress and prospects ［J］. *In Vitro Cellulr and Developmental Biology-Plant*, **40**: 427—433.

Engelmann F, Chabrillange N, Dussert S *et al.*, 1995. Cryopreservation of zygotic embryos and kernels of oil palm（*Elaeis guineensis* Jacq.）［J］. *Seed Science Research*, **5**: 81—86

Fabre J, Dereuddre J, 1990. Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips ［J］. *CryoLetters*, **11**: 413—426

Fahy GM, MacFarlane DR, Angell A *et al.*, 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation ［J］. *Cryobiology*, **21**: 407—426

Fang CX（方呈祥）, Zhang LZ（张珞珍）, Yue YY（岳莹玉）*et al.*, 1996. Cryopreservation of glutamic acid-producing strain-*Brevibacterium* sp. F9114 in liquid nitrogen ［J］. *Food and Fermentation Industries*（食品与发酵工作）, **6**: 18—21

Finkle BJ, Pereira ESaB, Brown MS, 1974. Freezing of nonwoody plant tissues. I. Effect of rate of cooling on damage to frozen beet root sections ［J］. *Plant Physiology*, **53**: 705—708

Fleck RA, Day JG, Clarke KJ *et al.*, 1999. Elucidation of the metabolic and structural basis for the cryopreservation recalcitrance of

Vaucheria sessilis ［J］. *CryoLetters*, **20**: 271—282

Fujikawa S, 1995. A freeze-fracture study designed to clarify the mechanisms of freezing injury of membranes in cortical parenchyma cells of mulberry ［J］. *Cryobiology*, **32**: 444—454

Fuller BJ, 2004. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state ［J］. *CryoLetters*, **25**: 375—388

Gonzalez-Arnao MT, Engelmann F, 2006. Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: Review and case study on sugarcane ［J］. *CryoLeters*, **27**: 155—168

Gonzalez-Arnao MT, Engelmann F, Huet C *et al.*, 1993. Cryopreservation of encapsulated apices of sugarcane: effect of freezing procedure and histology ［J］. *CryoLetters*, **14**: 303—306

Grout BB, 1979. Low temperature storage of imbibed seeds: a model for recalcitrant seed storage ［J］. *CryoLetters*, **1**: 71—76

Grout BWW, Shelton K, Pritchard HW, 1983. Orthodox behaviour of oil palm seed and cryopreservation of the excised embryo for genetic conservation ［J］. *Annals of Botany*, **52**: 381—384

Guo YQ（郭玉琼）, 2007. Studies on the Cryopreservation of Embryogenic Cultures from Longan（*Dimocarpus Longan* Lour.）and Litchi（*Litchi Chinensis* Sonn.）［D］. Ph. D Thesis of Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian

Gusta LV, Rajashekar C, Chen PM *et al.*, 1982. Freeze induced membrane permeability changes ［J］. *CryoLetters*, **3**: 27—34

Guy CL, Haskell D, 1987. Induction of freezing tolerance in spinach is associated with the synthesis of cold acclimation induced proteins ［J］. *Plant Physiology*, **84**: 872—878

Hatanaka T, Yasuda T, Yamaguchi T *et al.*, 1994. Direct regrowth of encapsulated somatic embryos of coffee（*Coffea canephora*）after cooling in liquid nitrogen ［J］. *CryoLetters*, **15**: 47—52

Hong TD, Linington S, Ellis RH, 1996. *Seed Storage Behaviour: a Compendium. Handbooks for Genebanks*: No. 4 ［M］. International Plant Genetic Resources Institues, Rome

Hor YL, Kim YJ, Ugap A *et al.*, 2005. Optimal hydration status for cryopreservation of intermediate oily seeds: *Citrus* as a case study ［J］. *Annals of Botany*, **95**: 1153—1161

Hor YL, Stanwood PC, Chin HF, 1990. Effects of dehydration on freezing characteristics and survival in liquid nitrogen of three recalcitrant seeds ［J］. *Pertanika*, **13**: 309—314

Hu J（胡晋）, Gou CG（郭长根）, 1996. Studies on the cryopreservation（−196℃）of pollen of restoring line in hybrid rice ［J］. *Acta Agronomica Sinica*（作物学报）, **22**: 72—77

Iriondo JM, Pérez C, Pérez-García F, 1992. Effect of seed storage in liquid nitrogen on germination of several crop and wild species ［J］. *Seed Science and Technology*, **20**: 165—171

Isaaca C, Mycock D, 1999. Ultrastructural effects of early imbibition and cryostorage on *Zea mays* L. root meristems ［J］. *CryoLetters*, **20**: 183—192

Jensen M, Oettmeier W, 1984. Effects of freezing on the structure of chloroplast membranes ［J］. *Cryobiology*, **21**: 465—473

Jian LC（简令成）, Sun LH（孙龙华）, 1989. Cryopreservation of the stem segments in Chinese gooseberry ［J］. *Journal of Integrative Plant Biology*（植物学报）, **31**: 66—68

Jiang XC（姜孝成）, Yang XQ（杨晓泉）, Fu JR（傅家瑞）*et al.*, 1996. Differences between the water status in orthodox seeds and that in recalcitrant seeds ［J］. *Acta Scientiarum Naturalium University Normalis Hunanensis*（湖南师范大学自然科学学报）, **19**: 54—58

Jones KS, McKersie BD, Paroschy J, 2000. Prevention of ice propagation by permeability barriers in bud axes of *Vitis vinifera* ［J］. *Canadian Journal of Botany*, **78**: 3—9

Karlsson JOM, Toner M, 2000. Cryopreservation ［A］. In: Lanza RP, Langer R, Vacanti J eds, *Principles of Tissue Engineering*（*Second Edition*）［M］. Academic Press, 293—307

Kartha KK, Leung NL, Mroginski LA, 1982. In vitro growth responses and plant regeneration from cryopreserved meristems of cassava（*Manihot esculenta* Crantz）［J］. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, **107**: 133—140

Kaurin A, Stushnoff C, 1985. Influence of dimethyl sulfoxide on freezing resistance of lettuce seeds ［J］. *Cryobiology*, **22**: 569—573

Keefe PD, Moore KG, 1981. Freeze desiccation: a second mechanism for the survival of Hydrated lettuce（*Lactuca sativa* L.）seed at sub-zero temperatures ［J］. *Annals of Botany*, **47**: 635—645

Kendall EJ, Kartha KK, Qureshi JA *et al.*, 1993. Cryopreservation of immature spring wheat zygotic embryos using an abscisic acid pretreatment ［J］. *Plant Cell Reports*, **12**: 89—94

King MW, Roberts EH, 1979. *The Storage of Recalcitrant Seeds——Achievement and Possible Approaches* ［M］. A report on a literature review carried out for the International Board for Plant Genetic Resources, Rome, 45

Kobayashi T, Niino T, Kobayashi M, 2005. Simple cryopreservation protocol with an encapsulation technique for tobacco BY-2 suspension cell culture ［J］. *Plant Biotechnology*, **22**: 105—112

Koster KL, Lynch DV, 1992. Solute accumulation and compartmentation during the cold acclimation of *Puma rye* ［J］. *Plant Physiology*, **98**: 108—113

Krishnapillay B, 2000. Towards the use of cryopreservation as a technique for conservation of tropical recalcitrant seeded species ［A］. In: Razdan MK ed, *Conservation of Plant Genetic Resources in vitro*. Volume 2: *Application and Limitation* ［M］. Science Publishers, Inc, 139—166

Lee DH, Lee CB, 2000. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays ［J］. *Plant Science*, **159**: 75—85

Levitt J, 1962. A sulfhydryl-disulfide hypothesis of frost injury and resistence in plants ［J］. *Journal of Theoretical Biology*, **3**: 355—391

Li GF（李国风）, Ye HC（叶和春）, Dong JW（董教望）*et al.*,

1992. Cryopreservation of calli of *Arnebia euchroma* [J]. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), **34**: 962—964

Li JR (李嘉瑞), Guo YP (郭延平), Wang MZ (王民柱), 1996. Cryopreservation of cultured *Actinidia deliciosa* calli [J]. *Journal of Fruit Science* (果树科学), **13**: 88—91

Liang L (梁立), Xu BF (徐秉芳), Zheng CY (郑从义) *et al*., 1993. Pollen cryopreservation and pollen protoplast isolation in *Brassica campestris* var. *purpurea* [J]. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), **35** (10): 733—738

Liao AF (廖爱芳), Lin YZ (林永珠), 1999. Cryopreservation of actinomycetes in liquid nitrogen [J]. *Microbiology* (微生物学通报), **26**: 272—274

Lipman CB, 1936. Normal viability of seeds and bacterial spores after exposure to temperature near the absolute zero [J]. *Plant Physiology*, **11**: 201—205

Lipman CB, Lewis GN, 1934. Tolerance of liquid air temperature by seed of higher plant for 60 days [J]. *Plant Physiology*, **9**: 392—394

Liu T (刘涛), Zhang J (张静), Meng XH (孟祥红) *et al*., 2006. Studies of ultralow cryopreservating female gametophytes clone of *Laminaria japonica* [J]. *Acta Oceanologica Sinica* (海洋学报), **28**: 175—177

Liu XW (刘贤旺), Du Q (杜勤). 1996. Calli cryopreservation of *Magnolia biloba* (Rehd et Wils) Cheng [J]. *Journal of Plant Resources and Environment* (植物资源与环境学报), **5**: 9—13

Liu Y, Nasrallah M, Gao RF, 1999. Cryopreservation of *Arabidopsis thaliana* seedling by vitrification [J]. *Forestry Studies in China*, **1**: 11—18

Liu Y (刘燕), Zhou H (周慧), Fang B (方标), 2001. Cryopreservation of seeds of ornamental plants [J]. *Journal of Beijing Forestry University* (北京林业大学学报), **23**: 39—44

Liu Y (刘燕), Zhang YL (张亚利), 2004. Pollen cryopreservation of *Prunus mume* [J]. *Journal of Beijing Forestry University* (北京林业大学学报), **26**: 22—25

Lockett MC, Luyet BJ, 1951. Survival of frozen seeds of various water contents [J]. *Biodynamica*, **7**: 67—76

Luo MZ (罗美中), Jiang SY (蒋双英), Tang HX (汤辉仙), 1990. Cryopreservation of suspension cell line derived from the protoplast culture of *Brassica campestria* var. *pekinensis* [J]. *Journal of Integrative Plant Biology* (植物学报), **32**: 432—437

Lynch DV, Steponkus PL, 1987. Plasma membrane lipid alteration associated with cold acclimation of winter rye seedlings (*Secale cereale* L. cv Puma) [J]. *Plant Physiology*, **83**: 761—767

Ma FW (马锋旺), Li JR (李嘉瑞), 1998. Cryopreservation of apricot protoplasts [J]. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), **25**: 329—332

Ma FW (马锋旺), Li JR (李嘉瑞), 1999. Cryopreservation of apricot calli [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica* (西北植物学报), **19**: 67—70

Mari S, Engelmann F, Chabrillange N *et al*., 1995. Histo-cytological study of apices of coffee (*Coffea reacemosa* and *C. sessiliflora*) in vitro plantlets during their cryopreservation using the encapsulation-dehydration technique [J]. *CryoLetters*, **16**: 289—298

Matsumoto T, Sakai A, Takahashi C *et al*., 1995. Cryopreservation of in vitro-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by encapsulation-vitrofication method [J]. *CryoLetters*, **16**: 189—196

Mazur P, 1984. Freezing of living cells: mechanisms and applications [J]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, **247**: 125—142.

Mazur P, Leibo SP, Chu EHY, 1972. A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells [J]. *Experimental Cell Research*, **71**: 345—355

Morton WM, 1969. Effects of freezing and hardening on the sulfhydryl group of protein fractions from cabbage leaves [J]. *Plant Physiology*, **44**: 168—172

Normah MN, Chin HF, Hor YL, 1986. Desiccation and cryopreservation of embryonic axes of *Hevea brasiliensis* Muell. -Arg [J]. *Pertanika*, **9**: 299—303

Panis B, Piette B, Swennen R, 2005. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae [J]. *Plant Science*, **168**: 45—55

Panis B, Totté N, van Nimmen K *et al*., 1996. Cryopreservation of banana (*Musa* spp.) meristem cultures after preculture on sucrose [J]. *Plant Science*, **121**: 95—106

Paulet F, Engelmann F, Glaszmann JC, 1993. Cryopreservation of apices of in vitro plantlets of sugarcane (*Saccharum* sp. *hybrids*) using encapsulation/deshydration [J]. *Plant Cell Reports*, 12: 525—529

Pence VC, 1990. Cryostorage of embryo axes of several large-seeded temperature tree species [J]. *Cryobiology*, **27**: 212—218

Pence VC, 1991a. Cryopreservation of immature embryos of *Theobroma cacao* [J]. *Plant Cell Reports*, **10**: 144—147

Pence VC, 1991b. Cryopreservation of seeds of Ohio native plants and related species [J]. *Seed Science and Technology*, **19**: 235—251

Pence VC, 1992. Desiccation and survival of *Aesculus*, *Castanea*, and *Quercus* embryo axes through cryopreservation [J]. *Cryobiology*, **29**: 391—399

Plessis P, Leddet C, Dereuddre J, 1991. Resistance to dehydration and to freezing in liquid nitrogen of alginate-coated shoot-tips of grape vine (*Vitis vinifera* L. cv Chardonnav) [J]. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciencs Paris*, t. 313, Série III: 373—380

Polge C, Smith AU, Parkes AS, 1949. Revival of spermatazoa after vitrification and dehydration at low temperature [J]. *Nature*, **164**: 666

Pritchard HW, Dickie JB, 2003. Predicting seed longevity: the use and abuse of seed viability equations [A]. In: Smith RD, Dickie JB, Linington SL *et al*. eds, *Seed Conservation*: *turning science in-*

to practices ［M］. Kew: Royal Botanic Gardens, Kew, 653—722

Pritchard HW, Grout BWW, Short KC, 1986a. Osmotic stress as a pregrowth procedure for cryopreservaton. 1. Growth and ultrastructure of sycamore and soybean cell suspensions ［J］. *Annals of Botany*, **57**: 41—48b

Pritchard HW, Grout BWW, Short KC, 1986b. Osmotic stress as a pregrowth procedure for cryopreservaton. 2. Water relations and metabolic state of sycamore and soybean cell suspensions ［J］. *Annals of Botany*, **57**: 371—378

Pritchard HW, Grout BWW, Short KC, 1986c. Osmotic stress as a pregrowth procedure for cryopreservation. 3. Cryobiology of sycamore and soybean cell suspensions ［J］. *Annals of Botany*, **57**: 379—387

Pritchard HW, Manger KR, 1998. A calorimetric perspective on desiccation stress during preservation procedures with recalcitrant seeds of *Quercus robur* L. ［J］. *CryoLetters*, *Supplement No.*, **1**: 23—30

Pritchard HW, Prendergast FG, 1986. Effects of desiccation and cryopreservation on the *in vitro* viability of the recalcitrant seed species *Araucaria hunsteinii* K. Schum ［J］. *Journal of Experimental Botany*, **37**: 1388—1397

Quatrano RS, 1968. Freeze-preservation of cultured flax cells utilizing dimethysulfoxide ［J］. *Plant Physiology*, **43**: 2057—2061

Rall WF, Fahy GM, 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at −196℃ by virification ［J］. *Nature*, **313**: 573—575

Reed BM, 1998. Cold acclimation as a method to improve survival of cryopreserved *Rubus* meristems ［J］. *CryoLetters*, **7**: 166—171

Reed BM, Dumet D, Denoma JM *et al.*, 2001. Validation of cryopreservation protocols for plant germplasm conservation: a pilot study using *Ribes* L ［J］. *Biodiversity and Conservation*, **10**: 939—949

Robert EH, King MW, Ellis RH, 1984. Recalcitrant seeds: their recognition and storage ［A］. In: Holder JHW, Williamss JT eds, *Crop Genetic Resources: Conservation and Evaluation* ［M］. George Allen & Unwin, London, 38—52

Roberts EH, 1973. Predicting the storage life of seeds ［J］. *Seed Science and Techonology*, **1**: 499—514

Roberts EH, 1975. Problems of long-term storage of seed and pollen for genetic resources conservation ［A］. In: Frankel OH, Hawkes JG eds, *Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow* ［M］. Cambridge University Press, London, 269—294

Sakai A, 1965, Survival of plant tissue at super-low temperatures III. Relation between effective prefreezing temperatures and the degree of frost hardiness ［J］. *Plant Physiology*, **40**: 882—887

Sakai A, 1966. Survival of plant tissue at super-low temperature. IV. Cell survival with rapid cooling and rewarming ［J］. *Plant Physiology*, **41**: 1050—1054

Sakai A, Engelmann F, 2007. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: A review ［J］. *CryoLetters*, **28**: 151—172

Sakai A, Noshiro M, 1975. Some factors contributing to the survival of crop seeds cooled to the temperature of liquid nitrogen ［A］. In: Frankle OH, Hawkes JG eds, *Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow* ［M］. Cambridge University Press, London/New York, 317—326

Sakai A, Otsuka K, 1967. Survival of plant tissue at super-low temperature. V. An electron microscope study of ice in cortical cells cooled rapidly ［J］. *Plant Physiology*, **42**: 1680—1694

Sala F, Cella R, Rollo F, 1979. Freeze preservation of rice cells grown in suspension culture ［J］. *Physiologia Plantarum*, **45**: 170—176

Selby AD, 1901. Germination of the seeds of some common cultivated plants after prolonged immersion in liquid air ［J］. *Bullentin of the Torrey Botanical Club*, **28**: 675—679

Senaratna T, Kott L, Beversdorf WD *et al.*, 1991. Desiccation of microspore derived embryos of oilseed rape (*Brassica napus* L) ［J］. *Plant Cell Reports*, **10**: 342—344

Shivanna KR, Heslop- Harrison J, 1981. Membrane state and pollen viability ［J］. *Annals of Botany*, **47**: 759—770

Siminovitch D, Briggs DR, 1949. The chemistry of the living bark of the black locust tree in relation to frost hardiness. I. Seasonal variations in protein content ［J］. *Archives of Biochemistry*, **23**: 8—17

Stanwood PC, 1985. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation ［A］. In: Kartha KK ed, *Cryopreservation of Plant Cells and Organs* ［M］. CRC, Boca Raton, FL, 199—226

Stanwood PC, 1987. Survival of sesame seed at the temperature (−196℃) of liquid nitrogen ［J］. *Crop Science*, **27**: 327—331

Stanwood PC, Bass LN, 1981. Seed germplasm preservation using liquid nitrogen ［J］. *Seed Science and Technology*, **9**: 423—437

Stanwood PC, Roos EE, 1979. Seed storage of several horticultural species in liquid nitrogen (−196℃) ［J］. *HortScience*, **14**: 628—530

Steponkus PL, 1984. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation ［J］. *Annual Review of Plant Physiology*, **35**: 543—584

Styles ED, Burgess JM, Mason C *et al.*, 1982. Storage of seed in liquid nitrogen ［J］. *Cryobiology*, **19**: 195—199

Sun CN, 1958. The survival of excised pea seedlings after drying and freezing in liquid nitrogen ［J］. *Botanical Gazette*, **119**: 234—236

Sun WQ, Leopold AC, 1994. Glassy state and seed storage stability: A viability equation analysis ［J］. *Annals of Botany*, **74**: 601—604

Suzuki M, Ishikawa M, Akihama T, 1998. A novel preculture method for induction of desiccation tolerance in genetian axillary buds for cryopreservation ［J］. *Plant Science*, **135**: 69—76

Tang DT (唐定台), Yang ZQ (杨志琦), Yamada Y (山田康之), 1988. Cryopreservation of protoplast-derived cell suspensions of rice (*Oriza satival*) ［J］. *Journal of Integrative Plant*

Biology（植物学报）, **30**: 357—361

Tao D, Li PH, Carter JV, 1983. Role of cell wall in freezing tolerance of cultured potato cells and their protoplasts［J］. *Physiologia Plantarum*, **58**: 527—532

Thammasiri K, 1999. Cryopreservation of embryonic axes of jackfruit［J］. *CryoLetters*, **20**: 21—28

Touchell D, Walters C, 2000. Recovery of embryos of *Zizania palustris* following exposure to liquid nitrogen［J］. *CyroLetters*, **21**: 261—270

Touchell DH, 1993. Cryopreservation of seed of Western Australian native species［J］. *Biodiversity and Conservation*, **2**: 592—602

Touchell DH, Dixon KW, 1994. Cryopreservation for seedbanking of Australian species［J］. *Annals of Botany*, **74**: 541—546

Uemura M, Yoshida S, 1984. Involvement of plasma membrane alterations in cold acclimation of winter rye seedling（*Secale cereale* L. cv Puma）［J］. *Plant physiology*, **75**: 818—826

Varghese B, Naithani SC, 2008. Oxidative metabolism-related changes in cryogenically stored neem（*Azadirachta indica* A. Juss）seeds［J］. *Journal of Plant Physiology*, **165**: 755—765

Vasquez N, Salazar K, Anthony F *et al*., 2005. Variability in response of seed to liquid nitrogen exposure in wild coffee（*Coffea arabica* L.）［J］. *Seed Science and Technology*, **33**: 293—301

Vertucci CW, 1989a. Relationship between thermal transitions and freezing injury in pea and soybeans［J］. *Plant Physiology*, **90**: 1121—1128

Vertucci CW, 1989b. Effects of cooling rate on seed exposed to liquid nitrogen temperatures［J］. *Plant Physiology*, **90**: 1478—1485

Vertucci CW, Berjak P, Pammenter NW *et al*., 1991. Cryopreservation of embryonic axes of an homeohydrous（recalcitrant）seed in relation to calorimetric properties of tissue water［J］. *CryoLetters*, **12**: 339—350

Wang JH, Ge JG, Liu F *et al*., 1998. Ultrastructural changes during cryopreservation of rice（*Oryza sativa* L.）embryogenic suspension cells by vitrification［J］. *CryoLetters*, **19**: 49—54

Wang JH（王君晖）, Yan QF（严庆丰）, Huang CN（黄纯农）, 1996. Plant regeneration from barley（*Hordeum vulgare*）immature inflorescences cryopreservated by vitrification［J］. *Acta Botanica Sinica*（植物学报）, **38**: 730—734

Wang JH（王君晖）, Zhang YX（张毅翔）, Liu F（刘峰）*et al*., 1999. Cryopreservation of seeds, protocorms and protocorm-like-bodies of *Dendrobium candidum*［J］. *Acta Horticulturae Sinica*（园艺学报）, **29**: 59—61

Wang QH（王起华）, Zhang ED（张恩栋）, Wang B（王冰）*et al*., 1999. Cryopreservation of two marine *Diatoms* for mariculture［J］. *Journal of Liaoning Normal University*（Natural Science Edition）（辽宁师范大学学报（自然科学版））, **22**: 310—310

Wang QH（王起华）, Zhang ED（张恩栋）, Li DP（李大鹏）*et al*., 2000a. Cryopreservation of *Dunaliella salina* and *Platymonas helgolandica* var. *tsingtaoensis*［J］. *Acta Botanica Sinica*（植物学报）, **42**: 399—402

Wang QH（王起华）, Liu M（刘明）, Cheng AH（程爱华）, 2000b. Cryopreservation of the free living conchocelis of *Porphyra haitanensis* by encapsulation dehydration［J］. *Journal of Liaoning Normal University*（Natural Science Edition）（辽宁师范大学学报（自然科学版））, **23**: 387—390

Wang ZC（王子成）, Deng XX（邓新秀）, 2001. Cryopreservation of *Citrus* Shoot-tips by vitrification and regeneration［J］. *Acta Horticulturae Sinica*（园艺学报）, **28**: 301—306

Wang ZC（王子成）, Deng XX（邓新秀）, 2002. Cryopreservation of *Citrus* protoplasts［J］. *Journal of Henan University*（Natural Science）（河南大学学报（自然科学版））, **32**: 38—40

Wen B, Song SQ, 2007a. Acquisition of cryotolerance in maize embryos during seed development［J］. *CryoLetters*, **28**: 109—118

Wen B, Song SQ, 2007b. Acquisition and loss of cryotolerance in *Livistona chinensis* embryos during seed development［J］. *CryoLetters*, **28**: 291—302

Wen B（文彬）, 2008. On the compound quantitative characteristic traits of seed recalcitrance［J］. *Acta Botanica Yunnanica*（云南植物研究）, **30**: 76—88

Williams RJ, Leopold AC, 1989. Glassy state in corn embryos［J］. *Plant Physiology*, **89**: 977—981

Withers LA, 1986. Cryopreservation and genebanks［A］. In: Yeoman MM ed, *Plant Cell Culture Technology*［M］. Oxford: Blackwell Scientific Publishing

Withers LA, Street HE, 1977. Freeze-preservation of cultured plant cells. III. The pregrowth phase［J］. *Physiologia Plantarum*, **39**: 171—178

Woodstock LW, Tao KL, 1981. Preservation of imbibitional injury in low vigor soybean embryonic axes by osmotic control of water uptake［J］. *Physiologia Plantarum*, **51**: 133—139

Wu YJ, Huang XL, Xiao JN *et al*., 2003. Cryopreservation of Mango（*Mangifera indica* L.）embryogenic cultures［J］. *CryoLetters*, **24**: 303—314

Wu YJ（吴永杰）, Zhao YH（赵艳华）, Zhou MD（周明德）, 1999. A Study on cryopreservation of dormant apple shoot tips［J］. *Acta Agriculture Boreall-Sinica*（华北农学报）, **14**: 129—133

Xu BF, Han HM, Zheng CY *et al*., 1997. Cryopreservation of pollen by vitrification in *Brassica*［J］. *Wuhan University Journal of Natural Sciences*（武汉大学学报（自然科学版 英文版））, **2**: 120—123

Xu GB（徐刚标）, Yi W（易文）, He F（何方）*et al*., 2000a. Studies of in vitro conservation in Maidenhair tree germplasm［J］. *Journal of Central South Forestry University*（中南林学院学报）, **20**: 7—10

Xu GB（徐刚标）, He F（何方）, Huang XG（黄晓光）, 2000b. Studies of in vitro culture and conservation of Maidenhair tree（*Ginkgo bilobna* L.）germplasm［J］. *Journal of Central South Forestry University*（中南林学院学报）, **20**: 27—30

Xu Y (徐艳), Liu Y (刘燕), Shi L (石雷), 2006. Cryopreservation of spores of *Alsophila gigantea* var. *gigantea* Wall. ex Hook [J]. *Plant Physiology Communications* (植物生理学通讯), **42**: 55—57

Yin XH (殷晓辉), Shu LH (舒理慧), Zheng CY (郑从义) *et al.*, 1996. Cryopreservation and formation of regenerative plantlets of callus from wild rice [J]. *Journal of Wuhan Botanical Research* (武汉植物学研究), **14**: 247—252

Zavala ME, FInkle BJ, 1983. Ultrastructural changes in cultured sugarcane cells following the addition of cryoprotectants at two temperatures [J]. *CryoLetters*, **4**: 371—380

Zhang BZ (张北壮), Fu JR (傅家瑞), Xu SX (徐是雄), 1990. Studies on cryopreservation of seeds of crops and vegetables [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni* (中山大学学报 (自然科学版)), **29**: 115—121

Zhang ZH (章志宏), Hu ZL (胡中立), 2000. Regenerating plants from cryopreservation adventitious buds of haploids and their genetic stability in rice [J]. *Journal of Wuhan Botanical Research* (武汉植物学研究), **18**: 169—193

Zhao YH (赵艳华), Wu YJ (吴永杰), 2001. Study on cryopreservation of in vitro cultured *Cabernet france* shoot tips [J]. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), **28**: 62—64

Zhao YH (赵艳华), Wu YJ (吴永杰), Chen SY (陈霜莹) *et al.*, 1998. Cryopreservation of *in vitro* culture apple shoot tips by encapsulation-dehydration [J]. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), **25**: 93—95

Zhao YH (赵艳华), Wu YJ (吴永杰), Zhou MD (周明德), 1999. Cryopreservation of *in vitro* culture shoot tips of *Prunus mahaleb* [J]. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), **26**: 402—403

Zheng YS (郑郁善), Chen LG (陈礼光), Wang SF (王舒凤), 2001. Membrane permeability of *Castanopsis sclerophylla* after cryopreservation treatment [J]. *Journal of Fujian Agricultural University* (Natural Science) (福建农业大学学报), **30**: 315—319

Zheng YS (郑郁善), Chen LG (陈礼光), Li QR (李庆荣) *et al.*, 2002. Study of cryopreservation on *Castanea mollissima* seeds [J]. *Scientia Silvae Sinicae* (林业科学), **38**: 146—149

❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀ ❀

更 正 启 事

《云南植物研究》2009 年第 4 期发表杨君等作者论文“箭毒木种子蛋白质样品制备及双向电泳改良方法”，由于作者的疏忽，第一作者单位漏写了“中国科学院研究生院”，现予以更正。第一作者杨君单位为：

1 中国科学院昆明植物研究所，中国科学院青藏高原研究所昆明部，云南 昆明　650204；

2 中国科学院研究生院，北京　100094

《植物分类与资源学报》编辑部